

QuEChERS/高效液相色谱-串联质谱测定婴幼儿配方奶粉中氢化可的松和氟氢可的松醋酸酯

杨明, 伊璠, 胡筱静, 董秋花, 许晴, 李首道, 陈丹, 陈烨超, 卢跃鹏, 江小明, 涂凤琴
(武汉食品化妆品检验所, 湖北武汉 430012)

摘要:建立了婴幼儿配方奶粉中氢化可的松和氟氢可的松醋酸酯激素残留的高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)测定方法。样品经水分散后以乙腈提取, 氯化钠盐析, 以N-丙基乙二胺(primary secondary amine, PSA)和中性氧化铝($\text{Al}_2\text{O}_3\text{-N}$)净化, Waters XBridge C_{18} 色谱柱分离, 电喷雾正离子扫描, 多反应监测(MRM)模式检测, 基质匹配标准溶液外标法定量。在优化条件下, 目标化合物在3个加标水平(1.25、5.00、12.50 $\mu\text{g/kg}$)下的平均回收率为80.6%~102.1%, 相对标准偏差(RSD)为1.64%~4.22%, 方法检出限(LOD)为0.40 $\mu\text{g/kg}$, 方法定量限(LOQ)为1.25 $\mu\text{g/kg}$ 。应用本方法对28批次婴幼儿配方奶粉进行测定, 发现2批次样品检出氢化可的松。方法简便快速、灵敏度高、重现性好, 能满足婴幼儿配方奶粉中氢化可的松和氟氢可的松醋酸酯激素残留的快速检测要求。

关键词: 婴幼儿配方奶粉; 液相色谱-串联质谱; 氢化可的松; 氟氢可的松醋酸酯

文章编号: 1673-9078(2019)010-274-278

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.10.037

Determination of Hydrocortisone and Fludrocortisone Acetate in Infant Formulas Using QuEChERS-High Performance Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry

YANG Ming, YI Jun, HU Xiao-jing, DONG Qiu-hua, XU Qing, LI Shou-dao, CHEN Dan, CHEN Ye-chao,
LU Yue-peng, JIANG Xiao-ming, TU Feng-qin

(Wuhan Institute for Food and Cosmetic Control, Wuhan 430012, China)

Abstract: An analytical method was developed for simultaneous determination of hydrocortisone and fludrocortisone acetate in infant formulas using QuEChERS sample preparation with high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). The samples were dispersed by water, extracted with acetonitrile, salted out with sodium chloride, and then the extract was cleaned up with primary secondary amine (PSA) and aluminum oxide ($\text{Al}_2\text{O}_3\text{-N}$). The target compounds were separated on a Waters XBridge C_{18} column, determined using electrospray ionization (ESI) source in positive mode with the multiple reaction monitoring (MRM) acquisition mode and quantified with the matrix-matched external standard method. Under the optimal conditions, the average recoveries for the two hormones at three spiked levels (1.25, 5.00, 12.50 $\mu\text{g/kg}$) were in the range of 80.6%~102.1% with the relative standard deviations of 1.64%~4.22%. The limits of detection (LODs) were 0.40 $\mu\text{g/kg}$, and the limits of quantification (LOQs) were 1.25 $\mu\text{g/kg}$. This method was applied to analyze 28 batches of infant formulas, and hydrocortisone was found in two of them. The method is simple, rapid, sensitive, and reproducible, and can be applied to the rapid determination of hydrocortisone and fludrocortisone acetate in infant formulas.

Key words: infant formula; liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS); hydrocortisone; fludrocortisone acetate

收稿日期: 2019-04-20

基金项目: 湖北省自然科学基金项目(2018CFB340); 湖北省食品药品监督管理局科研项目(201602009)

作者简介: 杨明(1991-), 男, 工程师, 硕士研究生, 研究方向: 食品质量与安全

通讯作者: 涂凤琴(1987-), 男, 博士, 工程师, 研究方向: 食品质量安全检验与研究

氢化可的松、氟氢可的松醋酸酯属于糖皮质激素, 具有抗炎、抗毒、抗过敏等多种药理作用^[1,2]。由于其具有影响动物性别分化、促进动物生长等作用, 在畜牧生产中经常被使用, 从而导致动物乳源不同程度的激素残留问题^[3,4]。婴幼儿配方奶粉是婴儿、幼儿成长期不可或缺的营养食品, 其激素残留水平的高低将会影响着婴幼儿的正常发育和健康成长。因此, 建立婴

幼儿配方奶粉中氢化可的松和氟氢可的松醋酸酯分析方法对于监控婴幼儿配方奶粉中激素残留情况,保障婴幼儿食品安全具有重要的现实意义。

目前,动物源食品中激素类药物的测定方法主要有免疫分析法^[5]、液相色谱法(HPLC)^[6]、气相色谱-质谱法(GC-MS)^[7,8]和高效液相色谱-串联质谱法(HPLC-MS/MS)^[1,2,9,10]等。免疫分析法简便快速,但易出现交叉反应及假阳性,准确性较差。GC-MS法通常需要繁琐的衍生化处理过程,不易操作。HPLC法定性能力较弱,特异性较差;HPLC-MS/MS法因其具有灵敏度高、选择性好、通用性强和抗干扰能力强等特点,已成为动物源食品中激素残留分析的重要方法。在前处理技术方面,传统的前处理方法主要有液液萃取、固液萃取等。这些方法存在溶剂耗量大、操作较为繁琐等缺点。QuEChERS(Quick、Easy、Cheap、Effective、Rugged、Safe)技术最早是用于农药残留检测领域的一种快捷处理技术^[11],由于其具有操作简单、便捷高效、溶剂用量小等特点,后来被扩展到兽药残留检测领域^[12,13]。目前我国对于婴幼儿配方奶粉中氢化可的松和氟氢可的松醋酸酯等糖皮质激素的测定指定了相应的检验方法^[14],但该方法不包含奶粉基质。目前关于婴幼儿配方奶粉中激素测定的方法少见报道。本研究采用QuEChERS净化前处理技术,结合串联质谱的高选择性、高灵敏度优势,建立了QuEChERS-高效液相色谱-串联质谱(QuEChERS-HPLC-MS/MS)同时检测婴幼儿配方奶粉中氢化可的松和氟氢可的松醋酸酯两种激素类药物残留的分析方法。方法操作简便、重现性好、分析速度快,能够为婴幼儿配方奶粉中氢化可的松和氟氢可的松醋酸酯激素残留状况的监测提供有力的技术支撑。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

SCIEX 4500 Triple Quad 质谱仪(配有可用于电喷雾电离的Turbo V离子源),美国AB SCIEX公司;LC 30A液相色谱仪,日本岛津公司;Allegra X-15R Centrifuge离心机,美国贝克曼库尔特公司;Vortex-Genie 2涡旋振荡器,美国Scientific Industries公司;PM5-2000TL超声波清洗器,普律玛仪器公司;Milli-Q超纯水系统,美国Millipore公司;电子天平,梅特勒-托利多仪器有限公司。

氢化可的松(纯度99.8%)和氟氢可的松醋酸酯(纯度98.7%)均购于Dr.Ehrenstorfer公司;甲醇、乙腈(色谱纯),德国Merck公司;甲酸(色谱纯),

美国Sigma-Aldrich公司;十八烷基硅烷键合硅胶(C₁₈)、N-丙基乙二胺(PSA)、石墨化炭黑(GCB)、中性氧化铝(Al₂O₃-N)、弗罗里硅土(Florisil)均购于上海安谱科学仪器公司;氯化钠购于国药集团化学试剂有限公司;超纯水(18.2 MΩ·cm)由Milli-Q超纯水系统制得。

1.2 标准溶液配制

分别准确称取适量氢化可的松(Hydrocortisone)和氟氢可的松醋酸酯(Fludrocortisone acetate)标准品,用甲醇溶解,配制质量浓度约为10 μg/mL的标准储备液,于-18℃保存。临用时用空白样品基质提取液配制系列浓度的标准工作溶液,用于制作标准曲线。

1.3 样品前处理

婴幼儿配方奶粉充分混匀,准确称取2 g(精确至0.0001)试样置于50 mL具塞塑料离心管中,加入4.0 mL 50℃温水,涡旋使奶粉充分溶解,再加入10.0 mL乙腈,涡旋混匀,超声提取30 min,加入3 g氯化钠,涡旋振荡,以4750 r/min冷冻离心5 min。取2.0 mL上清液置于装有50 mg PSA和25 mg中性氧化铝(Al₂O₃-N)的离心管中,涡旋1 min,离心后取上清液过0.22 μm滤膜,供HPLC-MS/MS测定。

1.4 仪器条件

1.4.1 色谱条件

色谱柱: Waters XBridge C₁₈ (150 mm×2.1 mm, 5 μm); 柱温: 40℃; 进样量: 5 μL; 流动相A: 0.1%甲酸水; 流动相B: 乙腈; 梯度洗脱程序: 0~1.0 min, 10.0% B; 1.0~3.0 min, 10.0%~40.0% B; 3.0~5.0 min, 10.0%~90.0% B; 5.0~7.0 min, 90.0% B; 7.0~7.1 min, 90.0%~10.0% B; 7.1~10.0 min, 10.0% B

1.4.2 质谱条件

电离源: ESI 正离子模式; 扫描方式: 多反应监测(MRM)模式; 电喷雾电压(IS): 5000 V; 雾化气(GS1): 50.0 psi; 气帘气压力(CUR): 30 psi; 碰撞气体(CAD): Medium; 辅助气流速(GS2): 50 psi; 离子源温度(TEM): 450℃。

1.4.3 数据统计分析

AB SCIEX Analyst 1.6.3 软件用于数据自动采集和处理,采用Microsoft Excel 2013 软件进行图表绘制。

2 结果与讨论

2.1 质谱条件的优化

利用针泵进样将两种目标化合物的标准溶液注入质谱仪中优化质谱参数。分别采用ESI⁺和ESI⁻模式对两种激素进行母离子全扫描,结果表明氢化可的松和氟氢可的松醋酸酯在ESI⁺和ESI⁻模式下均有较高的质谱响应,在ESI⁺模式下信号稳定性较好。因此优先选择ESI⁺扫描模式,在该模式下两种化合物均产生

[M+H]⁺的母离子。对两种化合物进行二级碎片离子扫描,选择响应较高、干扰小的两个碎片离子用于定性定量分析,其中响应最高的碎片离子用于定量分析,同时优化各目标化合物的去簇电压(DP)、碰撞能量(CE)等质谱参数。目标化合物的质谱条件如表1所示。

表1 分析物的母离子、子离子等重要质谱参数

Table 1 Precursor ions, products ions, and other important MS parameters of the analytes				
分析物	母离子/(m/z)	子离子/(m/z)	去簇电压/V	碰撞能/V
氢化可的松	363.1	121.0*	85.0	45.0
	363.1	327.2	85.0	22.0
氟氢可的松醋酸酯	423.2	239.0*	115.0	35.0
	423.2	325.0	115.0	30.0

注: *表示定量离子。

2.2 色谱条件的优化

本实验选择 Waters XBridge C₁₈ (150mm×2.1mm, 5 μm) 色谱柱对氢化可的松和氟氢可的松醋酸酯两种激素进行分离分析。采用ESI⁺模式,流动相中加入适量的酸可以提高分析物的离子化效率,从而达到足够的灵敏度。因此,本研究比较了目标物在乙腈-0.1%甲酸水、乙腈-0.5%甲酸水、甲醇-0.1%甲酸水和甲醇-0.5%甲酸水等流动相体系中的峰响应变化。结果表明,以乙腈-0.1%甲酸水为流动相时,各目标化合物的峰形好且质谱响应高。因此,本实验采用乙腈-0.1%甲酸水作为流动相。

2.3 提取试剂优化

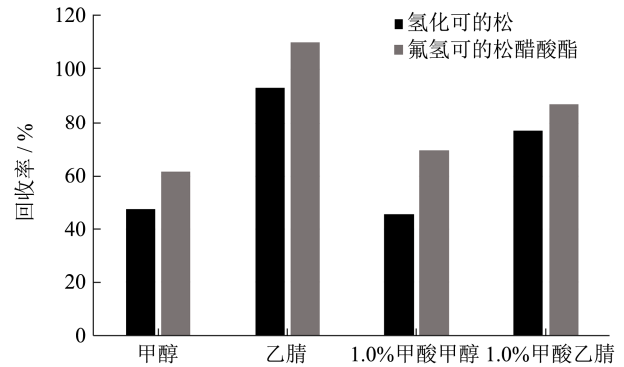


图1 不同提取溶剂对目标物回收率的影响

Fig.1 Effect of different extraction solvent on recovery of the target analytes

氢化可的松和氟氢可的松醋酸酯的极性较弱,参照标准方法尝试使用乙酸乙酯、叔丁基甲醚作为提取溶剂,结果发现乳化现象较严重。因此,本实验比较了甲醇、乙腈、1.0%甲酸甲醇和1.0%甲酸乙腈四种溶剂的提取效果。结果表明,甲醇和1.0%甲酸甲醇的提

取液较浑浊,提取杂质较多,且两种激素的回收率均低于70%。相比之下,乙腈的提取回收率较高,满足实验要求,并且乙腈具有较好的沉淀蛋白效果,因此本实验采用乙腈作为提取溶剂。不同提取溶剂对目标物回收率的影响如图1所示。

2.4 吸附剂的选择

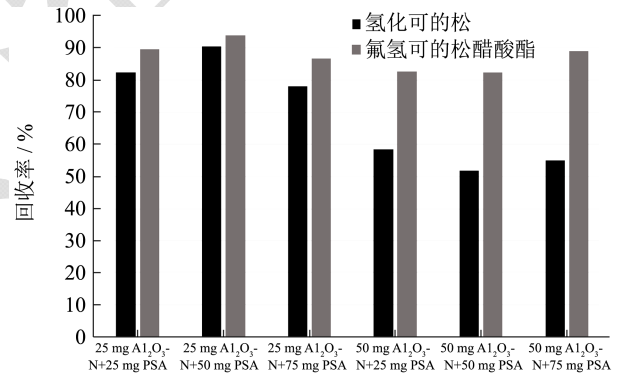


图2 不同净化剂组合对目标物回收率的影响

Fig.2 Effect of combinations of different purificants on the recoveries of the target analytes

婴幼儿配方奶粉基质中含有蛋白质、脂肪和糖类等多种有机成分,可能会对目标化合物的测定造成干扰。本实验考察了PSA、C₁₈、石墨化炭黑(GCB)、中性氧化铝(Al₂O₃-N)和弗罗里硅土(Florisil)等QuEChERS方法常用净化剂对目标化合物的净化效果和回收率情况。结果表明,GCB对氟氢可的松醋酸酯具有较强的吸附性;经PSA和Al₂O₃-N吸附剂净化的回收率较高,净化效果较好。进一步考察了PSA和Al₂O₃-N两种吸附剂组合的净化效果。结果表明(如图2所示),25 mg Al₂O₃-N+50 mg PSA净化效果最佳,基质干扰小,目标化合物的回收率均大于90%。若增加Al₂O₃-N,氢化可的松回收率降低较为显著;随着

PSA 增加,两种目标化合物的回收率开始下降。故实验最终采用 25 mg Al_2O_3 -N+50 mg PSA 的组合吸附剂对样品进行净化。

2.5 基质效应

基质效应 (Matrix Effect, ME) 是指目标化合物在离子化时受到其他组分的竞争而引起的分析信号变化,包括基质增强效应和基质抑制效应。基质效应可通过比较基质匹配标准曲线与溶剂标准曲线的斜率来评价。计算公式: $\text{ME} = \text{基质标准曲线斜率} / \text{溶剂标准曲线斜率}$ 。当 ME 为 0.85~1.15 时,基质效应不明显;当 $\text{ME} > 1.15$ 时,存在基质增强效应;当 $\text{ME} < 0.85$ 时,存在基质抑制效应^[15]。本实验对两种激素的基质效应进行了评价。结果表明,氢化可的松 ($\text{ME}=0.95$) 和氟氢可的松醋酸酯 ($\text{ME}=1.04$) 基质效应均在 0.85~1.15 之间。为使定量分析结果更加准确可靠,本实验采用基质匹配标准工作溶液作校准曲线来降低基质效应对测定结果的影响。

2.6 方法学考察

用空白基质提取液配制系列浓度的混合标准工作溶液,在优化的实验条件下分析测定,以峰面积为纵坐标 (y),质量浓度为横坐标 (x) 绘制标准曲线。结果表明,目标化合物在 0.25~50.00 ng/mL 的质量浓度范围内线性关系良好,线性相关系数 (r) 均大于 0.9990。以 3 倍信噪比 (S/N) 计算检出限 (LOD),以 10 倍信噪比 (S/N) 计算定量限 (LOQ),目标化合物的检出限均为 0.40 $\mu\text{g/kg}$,定量限为 1.25 $\mu\text{g/kg}$ 。选取阴性样品添加三个浓度水平 (1.25、5.00、12.50 $\mu\text{g/kg}$) 的混合标准溶液,每个加标水平做 6 个平行样,

以考察方法的回收率和精密度。结果见表 2,目标化合物的平均回收率为 80.6%~102.1%,相对标准偏差为 1.64%~4.22%,方法回收率高、精密度高,满足婴幼儿配方奶粉中氢化可的松和氟氢可的松醋酸酯激素残留监测的要求。婴幼儿配方奶粉加标样品和空白样品中氢化可的松和氟氢可的松醋酸酯的提取离子流图如图 3 所示。

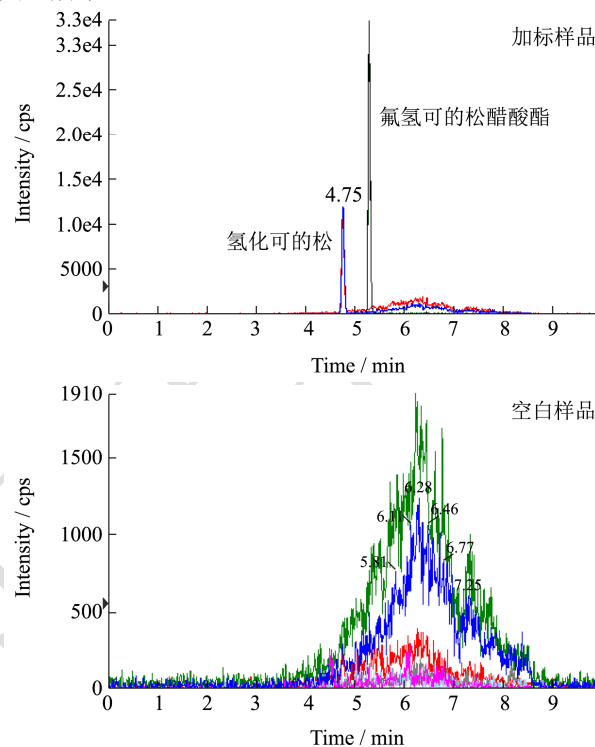


图3 加标样品和空白样品中氢化可的松和氟氢可的松醋酸酯的提取离子流图

Fig.3 Extracted ion chromatograms of hydrocortisone and fludrocortisone acetate in spiked and blank samples

表2 分析物的线性范围、线性方程、检出限、定量限、加标回收率和相对标准偏差

Table 2 Linear ranges, regression equations, limits of detection, limits of quantification, recoveries and the relative standard deviations

of the analytes (n=6)								
分析物	线性范围 (ng/mL)	线性方程	相关系数	LOD ($\mu\text{g/kg}$)	LOQ ($\mu\text{g/kg}$)	平均回收率/%		
						1.25 $\mu\text{g/kg}$	5.00 $\mu\text{g/kg}$	12.5 $\mu\text{g/kg}$
氢化可的松	0.25~50.00	$y=3.61 \times 10^3 x + 2.18 \times 10^3$	0.9997	0.40	1.25	83.1(3.51)	98.7(1.64)	99.6(2.33)
氟氢可的松醋酸酯	0.25~50.00	$y=3.60 \times 10^3 x + 2.55 \times 10^3$	0.9998	0.40	1.25	80.6(3.19)	99.2(4.22)	102.1(3.15)

2.7 实际样品测定

采用本方法对从市场上随机抽取的 28 批次婴幼儿配方奶粉 (14 批次 I 段, 7 批次 II 段, 7 批次 III 段) 进行了测定, 氟氢可的松醋酸酯均未检出; 2 批次样品检出氢化可的松, 检出含量分别为 4.02 $\mu\text{g/kg}$ 和 5.25

$\mu\text{g/kg}$ 。采用农业部 1031 号公告-2-2008《动物源性食品中糖皮质激素类药物多残留检测液相色谱-串联质谱法》标准方法对样品进行测定, 结果与本方法测得值相吻合。图 4 为典型婴幼儿配方奶粉阳性样品中目标化合物的提取离子流图。

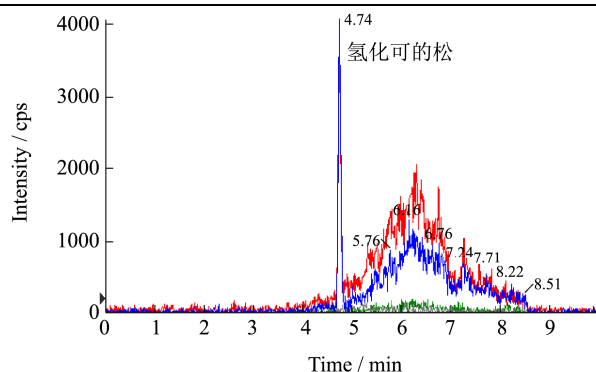


图4 典型婴幼儿配方奶粉阳性样品的提取离子流图

Fig.4 Extracted ion chromatograms of hydrocortisone in a typical positive infant formula sample

3 结论

本研究以乙腈为提取溶剂,采用 QuEChERS 前处理技术,结合高效液相色谱-串联质谱技术,通过优化色谱质谱条件,建立了快速测定婴幼儿配方奶粉中氢化可的松和氟氢可的松醋酸酯等两种激素的分析方法。方法简单快速、操作简便、灵敏可靠,并成功用于实际样品的测定,可作为婴幼儿配方奶粉中氢化可的松和氟氢可的松醋酸酯的定性定量检测手段,对于婴幼儿配方奶粉中激素残留情况的监测具有重要的应用价值。

参考文献

- [1] 崔晓亮,邵兵,赵榕,等.超高效液相色谱-串联电喷雾四极杆质谱法同时测定牛奶中 12 种糖皮质激素的残留[J].色谱,2006,24(3):213-217
CUI Xiao-liang, SHAO Bing, ZHAO Rong, et al. Simultaneous determination of 12 glucocorticoids residues in milk by ultra performance liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry [J]. Chinese Journal of Chromatography, 2006, 24(3): 213-217
- [2] Deceuninck Y, Bichon E, Monteau F, et al. Fast and multiresidue determination of 20 glucocorticoids in bovine milk using ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Journal of Chromatography A, 2013, 1294(11): 76-86
- [3] Cherlet M, De Baere S, De Backer P. Quantitative determination of dexamethasone in bovine milk by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-tandem mass spectrometry [J]. Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 2004, 805(1): 57-65
- [4] Harris A, Seckl J. Glucocorticoids, prenatal stress and the programming of disease [J]. Hormones & Behavior, 2011, 59(3): 279-289
- [5] Van den Hauwe O, Schneider M, Sahin A, et al. Immunochemical screening and liquid chromatographic-tandem mass spectrometric confirmation of drug residues in edible tissues of calves injected with a therapeutic dose of the synthetic glucocorticoids dexamethasone and flumethasone [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51(1): 326-330
- [6] Reig M, Mora L, Navarro J L, et al. A chromatography method for the screening and confirmatory detection of dexamethasone [J]. Meat Science, 2006, 74(4): 676-680
- [7] 赵超敏,古淑青,郑江,等.凝胶渗透色谱净化-气相色谱-质谱法测定黄油中 6 种激素的残留[J].现代食品科技,2018,34(4):281-286
ZHAO Chao-min, GU Shu-qing, ZHENG Jiang, et al. Detection of six steroid hormone residues in butter samples by gel permeation chromatography purification and gas chromatography-mass spectrometry [J]. Modern Food Science and Technology, 2018, 34(4): 281-286
- [8] Fritsche S, Schmidt G, Steinhart H. Gas chromatographic-mass spectrometric determination of natural profiles of androgens, progestogens, and glucocorticoids in muscle tissue of male cattle [J]. European Food Research and Technology, 1999, 209(6): 393-399
- [9] 房克艳,赵超敏,邓晓军,等.固相萃取-超高效液相色谱-三重四极杆质谱法同时测定饲料中 5 种雌激素[J].现代食品科技,2018,34(11):255-261
FANG Ke-yan, ZHAO Chao-min, DENG Xiao-jun, et al. Simultaneous determination of five estrogens in feed by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry coupled with solid phase extraction [J]. Modern Food Science and Technology, 2018, 34(11): 255-261
- [10] Chen D M, Tao Y F, Liu Z Y, et al. Development of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry with pressurized liquid extraction for determination of glucocorticoid residues in edible tissues [J]. Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 2011, 879(2): 174-180

(下转第 252 页)